

## Résumé

Des inoculations in vitro et in planta de folioles d'hévéa, par une suspension de conidies de *Corynespora*, montrent des différences de résistance-sensibilité (R/S) chez les clones testés. Cette R/S varie principalement avec l'isolat et avec ses divers facteurs environnementaux. Dans nos conditions, PB 260 apparaît très sensible alors que GT 1 est presque totalement résistant. L'excrétion d'une toxine, isolée et identifiée comme un petit glycopeptide de 7,5 kDa, a été confirmée. L'utilisation de cette toxine conduit au même classement R/S des 9 clones étudiés que l'inoculation par des conidies. La sensibilité d'un clone dépendrait de son aptitude à reconnaître cette toxine et/ou à sa capacité à la neutraliser. L'emploi de cette toxine, en application foliaire ponctuelle, conduirait à un classement précoce de la R/S des clones en milieu naturel. Des anticorps de cette toxine pourraient être utilisés pour rechercher une corrélation entre la virulence des isolats et leur production de toxine.

## Abstract

In vitro and in planta inoculation of Hevea leaflets with a *Corynespora* conidium suspension revealed differences in resistance/susceptibility (R/S) amongst the clones tested. The R/S varied primarily according to the isolate and various environmental factors. Under our conditions, PB 260 proved highly susceptible and GT 1 almost totally resistant. The secretion of a toxin, which was isolated and identified as a small, 7.5-kDa glycopeptide, was confirmed. Using this toxin resulted in the same R/S classification of the nine clones studied as inoculation with conidia. The susceptibility of a clone would seem to depend on its ability to recognise and/or neutralize the toxin. Using the toxin for leaf applications would enable early classification of the R/S of clones in the field, and antibodies could subsequently be used to establish the correlation between isolate virulence and toxin production.

## Resumen

Inoculaciones in vitro e in planta de folíolos de hevea mediante gotas de suspensión de conidios de *Corynespora* muestran diferencias de resistencia-sensibilidad (R/S) en los clones probados. Esta R/S varía principalmente con el aislado y con distintos factores de medio ambiente. En nuestras condiciones, PB 260 se revela muy sensible mientras que GT1 es casi totalmente resistente. Se confirmó la excreción de una toxina, aislada e identificada como un pequeño glicopeptido de 7,5 KDa. El uso de esta toxina lleva a la misma clasificación R/S de los 9 clones estudiados que la inoculación por conidios. La sensibilidad de un clon dependería de su aptitud a reconocer esta toxina y/o a su capacidad a neutralizarla. El empleo de esta toxina en aplicación foliar llevaría a una clasificación precoz de la R/S de los clones en medio natural. Podrían utilizarse anticuerpos de esta toxina para buscar una correlación entre la virulencia de los aislados y su producción de toxina.

# L'interaction entre *Corynespora cassiicola* et *Hevea brasiliensis*

Breton F.<sup>1</sup> Garcia D.<sup>2</sup>, Sanier C.<sup>3</sup>, Eschbach J.M.<sup>3</sup>, d'Auzac J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de biotechnologie et physiologie végétale appliquée, université Montpellier II, 34095 Montpellier Cedex 5, France

<sup>2</sup> Institut français du caoutchouc, 42 rue Scheffer, 75116 Paris, France

<sup>3</sup> CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

Les premières synthèses concernant les attaques de *Corynespora* ont été présentées en Thaïlande lors du symposium IRRDB de novembre 1987. Parmi les rares recherches publiées depuis, on doit retenir de courtes revues sur la chute des feuilles (Radziah et Hashim, 1990 ; Tam, 1990) et les nécroses foliaires (Chee, 1988a ; Gasparotto *et al.*, 1988 ; Kai-Ming et Chee, 1989) causées par *Corynespora*. Quelques publications plus fondamentales sur ce champignon, relativement peu connu, concernent la sporulation, la pathogénicité, et l'épidémiologie (Chee, 1988b), la symptomatologie de l'intensité photosynthétique après infection (Nugawela *et al.*, 1989), la pathogénicité et le polymorphisme de différents isolats (Sinulingga *et al.*, 1990 ; Chow *et al.*, 1992).

Les trois expressions anglaises *Birds eye's spot*, *leaf spot disease* et *leaf fall disease* concernent l'attaque par *Corynespora*. Cependant, plusieurs champignons peuvent conduire aux mêmes symptômes foliaires. Ainsi, pour Chee (1988b), *Corynespora cassiicola* est synonyme de *Corynespora melonis*, d'*Helminthosporium cassiicola*, d'*Helminthosporium vignae*, d'*Helminthosporium papayal*, et de *Corynespora vignicola*. Selon Kai-Ming et Chee (1989), *Birds eye's spot* est provoqué par *Drechslera heveae*, tandis que d'après Muchovej et Muchovej (1990) *Helmintho-*

*sporium heveae* serait en fait *Bipolaris heveae*.

L'analyse des régions internes (ITS) de l'ADN ribosomal (par RAPD) et l'analyse de l'ADN total par RFLP de Silva *et al.* (1995) ont permis de distinguer différentes souches de *Corynespora*, et d'*Helminthosporium* phylogénétiquement très proches et de différencier quelques isolats de *C. cassiicola* du Sri Lanka. Récemment, ce même type d'analyse d'ADNr provenant de 4 isolats de *Corynespora* récoltés aux Philippines, au Cameroun et au Gabon a révélé une homologie voisine de 100 % pour 600 paires de bases analysées et une homologie de 92,3 % avec le *Drechslera catenaria*, un loculoascomycète, également appelé *Helminthosporium catenarium*.

L'objectif de notre recherche est de tenter d'établir un classement de clones d'hévéa en fonction de leur R/S vis-à-vis de *C. cassiicola*. L'analyse des résultats publiés fait clairement apparaître que la résistance clonale dépend de l'isolat utilisé. Le clone GT 1, considéré comme peu sensible par Chee (1988a) en Malaisie et par Liyanage et Liyanage, (1986) au Sri Lanka, est devenu très sensible à Sunghi Puthi (Sumatra) et apparaît très résistant au Cameroun.

Le fait qu'une résistance totale (verticale), monogénique puisse être aisément contournée par le pathogène a conduit à préférer une résistance oligogénique (horizontale), résultante de l'association de mécanismes de défense multiples, même s'ils sont individuellement peu efficaces (Rivano *et al.*, 1989 ; Simmonds 1989). Il en

La teneur de cet article a fait l'objet d'une communication présentée au « Workshop on *Corynespora* leaf fall disease of *Hevea rubber* » organisé à Médan par l'Indonesian Rubber Research Institute, les 16 et 17 décembre 1996.

résulte, si l'on veut réaliser valablement une sélection de clones résistants, la nécessité de connaître les principaux mécanismes de défense de l'hévéa impliqués dans la résistance.

## Matériel et méthodes

Quelques clones d'hévéa greffés sur des *stumps* provenant de graines de GT 1 ont été cultivés en pots dans les serres tropicales de l'université Montpellier II et du Cirad<sup>1</sup>. Des feuilles ont été prélevées au stade B<sub>2</sub>-C (Hallé et Martin, 1986) et maintenues plusieurs jours en survie sur du papier humidifié dans des boîtes de Pétri fermées. Les folioles ont été, au préalable, inoculées par des gouttelettes de 10 µL d'une suspension de conidies de *Corynespora* (2-2,5.10<sup>4</sup> conidies/mL; 3 à 4 gouttelettes/cm<sup>2</sup>). Les suspensions conidiennes étaient obtenues après 10 jours de culture à l'obscurité, en boîte de Pétri sur milieu PDA, suivis de 3 jours à la lumière. Les spores ont été récoltées par grattage du mycélium en présence d'eau stérile.

D'autres inoculations ont été réalisées, au Cameroun, sur des clones cultivés dans des récipients en plastique, en chambre climatisée sur la plantation d'Hévécam (t = 27 ± 2° C, RH : 90-100 %, photopériode : 12 h). La suspension de spores de *Corynespora* (10<sup>5</sup> spores/mL), issue de la culture d'isolats monospores, était inoculée par vaporisation sur la face abaxiale de jeunes feuilles (stade B<sub>2</sub>-C).

## Méthodes d'estimation de la sensibilité clonale au *Corynespora*

Après inoculation de feuilles en boîte de Pétri, des observations visuelles et la mesure du diamètre des nécroses ont été réalisées, 1, 2, 3 et 4 jours après inoculation. Le brunissement des nervures, responsable de

l'aspect en « arête de poisson », la croissance du mycélium sur toute la surface foliaire ou sa limitation au site nécrotique ont été observés.

Sous un éclairage UV, les gouttelettes d'inoculum apparaissent fluorescentes moins de 24 h après inoculation et le restent plusieurs jours. Cette fluorescence est exclusivement provoquée par une phytoalexine de l'hévéa, la scopolétine (Scp) (Giesemann *et al.*, 1986), laquelle a été identifiée et quantifiée après TLC, HPLC et spectrofluorimétrie (Garcia *et al.*, 1995b).

L'analyse des peroxydases et de 2 protéines liées à la pathogénèse, les chitinases et les β-1,3 glucanases a été effectuée sur des feuilles, après homogénéisation et extraction par un tampon à pH 5,5.

Du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) est produit instantanément par des disques foliaires mis au contact d'un filtrat de culture de *Corynespora*. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été analysé par chimiluminescence du luminol grâce à un compteur à scintillation, selon le mode *out of coincidence* par une méthode développée par Belmas (1996).

Lorsque les inoculations étaient réalisées en chambre climatisée, les observations concernaient essentiellement la symptomatologie, en prenant en compte des critères précédemment définis lors d'une recherche à long terme sur l'interaction *Microcyclus ulei*-hévéa (Rivano, 1992 ; Garcia, 1995). La taille et le nombre des lésions, l'accumulation de la Scp, le temps écoulé entre l'inoculation et le développement de l'infection, la fréquence de l'infection, la sévérité de la maladie, le temps nécessaire à la formation des stromas, la déformation et la chute des feuilles ont été pris en compte, en tant que composants majeurs de la résistance.

Des observations histologiques ont été réalisées sur des coupes de folioles inoculées. Le bleu de toluidine et le phloroglucinol ont révélé, respectivement, les phénols et la lignine (Garcia *et al.*, 1995a).

## Résultats

Plus de 10 années d'expérimentation sur l'interaction *Microcyclus ulei*-*Hevea brasiliensis* ont abouti à définir les paramètres symptomatologiques nécessaires pour déterminer le degré clonal de R/S. Deux paramètres biochimiques permettent de détecter 2 autres composants partiellement corrélés avec les mécanismes de résistance de l'hévéa. Le premier est constitué par la vitesse et l'importance de l'accumulation de la phytoalexine (Scp). Le second, plus tardif, est la mise en place d'une barrière de lignine encageant le champignon à l'intérieur de la zone nécrotique.

Au laboratoire de Montpellier, des feuilles détachées de différents clones ont été inoculées avec des souches de *Corynespora*, provenant des Philippines, du Cameroun et du Gabon. Le GT 1 montre une résistance totale (RT) vis-à-vis des 4 isolats, tandis que le PB 260 s'avère très sensible (S). Les clones PB 235 et RRIC 100 font preuve d'une résistance partielle. La taille des nécroses, leur aspect « arête de poisson » le développement du mycélium à l'intérieur et à l'extérieur de la nécrose traduisent le niveau R/S de ces 4 clones (planche 1).

L'attaque par *Corynespora* est très rapide, les premiers symptômes visuels d'infection apparaissent 24 h après inoculation, alors que, dans les mêmes conditions avec *Colletotrichum gloeosporioides*, il faut attendre 48 h.

Au Cameroun, des expériences ont été réalisées sur des feuilles non détachées et en chambre climatique sur les clones GT 1 et RRIC 100 inoculés par un isolat local de *C. cassicola*, à des concentrations variant entre 7.10<sup>4</sup> et 3,5.10<sup>2</sup> spores/mL. Les résultats confirment la résistance du GT 1 et la sensibilité du RRIC 100 pour les plus fortes densités d'inoculum (tableau 1).

Cinq isolats monospores de *Corynespora* prélevés sur des arbres du clone PB 260 ont été inoculés sur des feuilles au stade B<sub>2</sub>,

<sup>1</sup> Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement.

Tableau 1. Influence de la quantité de spores de *Corynespora* inoculées à un clone d'hévéa résistant (GT 1) ou sensible (RRIC 100). / Effect of the quantity of *Corynespora* spores inoculated on a resistant and on a susceptible Hevea clone.

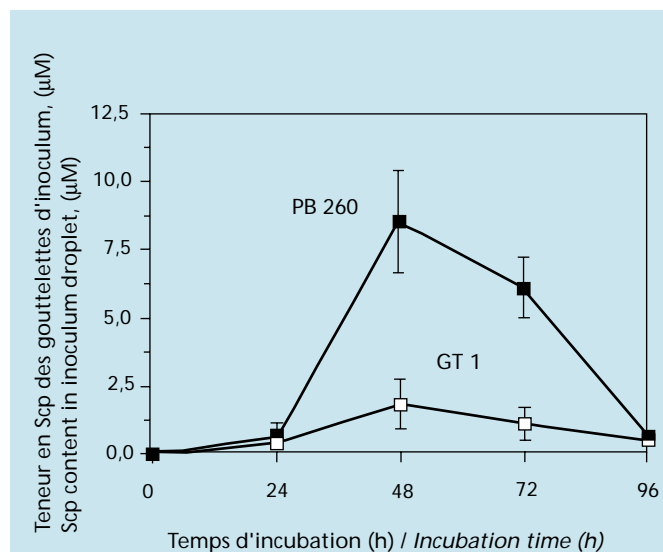
Spores par mL* Spores per mL*	Clones Clones	Intensité (0-3) de sporulation Sporulation intensity (0-3)	Nombre de lésions Number of lesions (10 cm <sup>2</sup> )	Diamètre des lésions Lesion diameter (mm)	Intensité de l'attaque (1-5) Attack intensity (1-5)
700	GT 1	0	21	< 0,5	1
	RRIC 100	3	102	< 0,5	5
350	GT 1	0	15	< 0,5	1
	RRIC 100	1	62	1	3
35	GT 1	0	13,3	< 0,5	1
	RRIC 100	0	8	1	1
3,5	GT 1	0	10	< 0,5	1
	RRIC 100	0	2	1	0

\*x 100.

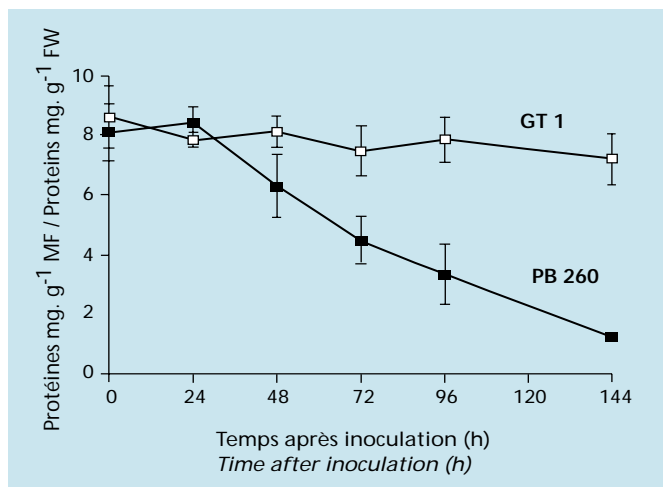
Tableau 2. Sensibilité de feuilles clonales d'hévéa aux stades B<sub>2</sub> et C à différents isolats de *Corynespora*. / Susceptibility of clonal Hevea leaves to different *Corynespora* isolates at stages B2 and C.

Clones Clones	Stades Stages	Isolats de <i>Corynespora casiicola</i> <i>Corynespora casiicola</i> isolates				
		B2	B6	B8b	B10b	B12b
RRIC	B <sub>2</sub> C	S S	S S	S R	S PR	S PR
GT 1	B <sub>2</sub> C	R R	R R	R R	R R	R R
Avros 2037	B <sub>2</sub> C	R S	R R	R R	R PR	PR R
RRIM 706	B <sub>2</sub> C	PR PR	R PR	R R	PR R	PR PR
PR 107	B <sub>2</sub> C	R PR	R S	R PR	R S	R S

R : résistant / resistant S : sensible / susceptible PR : partiellement résistant / partially resistant



**Figure 1.** Cinétique d'accumulation de la scopolétine après inoculation *in vitro* par *Corynespora casiicola*. PB 260 : sensible, GT 1 : résistant. / *Scopoletin* accumulation kinetics after *in vitro* inoculation with *Corynespora casiicola*. PB 260: susceptible, GT 1: resistant.



**Figure 2.** Evolution de la teneur en protéines des feuilles d'un clone résistant (GT 1) et d'un clone sensible (PB 260) après inoculation en boîte de Pétri par un isolat de *Corynespora*. Evolution of the protein contents of leaves from a resistant (GT 1) and a susceptible clone (PB 260) after inoculation in Petri dishes with a *Corynespora* isolate.

prélevés sur 5 clones afin de les classer quant à leur R/S. Il a été tenu compte de la durée d'inoculation, du temps nécessaire à la sporulation, du nombre des lésions et de l'importance de la déformation foliaire. On constate (tableau 2) que les isolats mono-

spores, provenant du même clone sensible, montrent des différences d'agressivité (R, S ou RP). Le même type d'expérience réalisé sur des feuilles plus âgées (stade C) conduit à quelques différences. Ainsi la sensibilité du RRIC 100 diminue tandis que

celle du RP 107 augmente (tableau 2). Le classement de ces clones, dans nos conditions expérimentales, selon la diminution de la résistance, conduit à : GT 1 = PR 107 > Avros 2037 > RRIM 706 > RRIC 100.

La rapidité et l'importance de l'accumulation de la Scp ont été corrélées avec la résistance de l'hévéa au *Microcyclus* (Garcia *et al.*, 1995 *a,b*). Chez le clone GT 1 la production de Scp apparaît trop lente et trop faible pour expliquer sa résistance à *C. casiicola* (figure 1) (Breton *et al.*, 1997).

Alors que la teneur en protéine des feuilles de GT 1, inocuées en boîte de Pétri, reste stable durant les 6 jours de l'expérience, une forte et rapide diminution de cette teneur rend compte de l'importante dégradation des tissus chez PB 260 (figure 2).

La cinétique de formation de deux protéines de défense (*Pathogenesis Related proteins*), la chitinase (figure 3) et la  $\beta$ -1,3 glucanase (figure 4) est également inadéquate pour expliquer la différence de R/S des clones GT 1, PB 235 et PB 260. Seules, les activités peroxydases (guaiacol-oxydases), souvent impliquées dans les mécanismes de résistance, apparaissent significativement supérieures chez le GT 1 (figure 5) (Breton *et al.*, 1996).

Lors des premières 48 h suivant l'inoculation, l'arrêt de la propagation du mycélium ne peut être relié à un renforcement des parois par dépôt de lignine. Celui-ci n'a pas pu être observé avant 10 jours environ pour les 3 clones. Si, cependant, on ne peut exclure un renforcement précoce des parois par réticulation des protéines pariétales (d'Auzac, 1996), les mécanismes de défense du GT 1 restent encore inconnus.

L'examen de coupes de feuilles inocuées avec la souche philippine de *Corynespora* permet de constater d'importantes différences entre un clone sensible et un résistant. Ainsi, 48 h après inoculation, de petits *spots* nécrotiques limités à quelques cellules entourant la zone de pénétration sont visibles chez le GT 1 et une substance jaune non identifiée s'accumule dans la zone nécrosée. Autour de cette zone, la présence de grains d'amidon et l'aspect des noyaux traduisent l'absence d'infection (planche 2). Les coupes de feuilles du PB 260, très sensible, sont très différentes ; la plus grande part des cellules, bien au-delà de la zone de pénétration, semblent vides, la condensation des noyaux indique leur dégénérescence et les grains d'amidon sont absents. Presque toutes les cellules observables, largement au-delà de la nécrose, sont dégénérantes. Cette observation conduit à faire

l'hypothèse de l'intervention d'une toxine, rapidement produite par *Corynespora*.

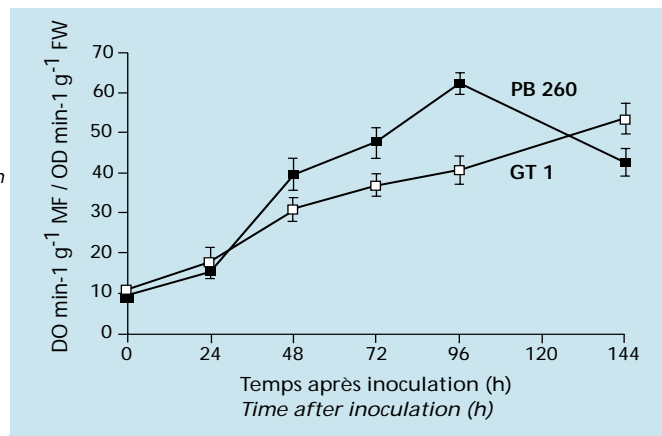
En effet, plusieurs auteurs ont signalé la présence d'une toxine excrétée par *C. cassicola* dans des milieux de culture liquides (Onesiran *et al.*, 1975 ; Sarma et Nayudu, 1975). Cependant, pour les premiers, la toxine est un composé hydrophile cationique, tandis que pour les seconds elle est hydrophobe et soluble dans des solvants tels le benzène et l'acétate d'éthyle. L'existence d'une toxine produite par *Corynespora* a été aussi signalée par Purwantara (1987) et Nugalewa *et al.* (1989). Liyanage et Liyanage (1986) ont préparé un filtrat brut d'un milieu de culture de *Corynespora* et placé 1 µL de cet extrait, *in vivo* ou *in planta*, à la surface de feuilles, préalablement blessées par la piqure d'une fine aiguille. La mesure de la taille de la nécrose après 72-96 h, ou l'importance de la chute des feuilles après une semaine, ont conduit ces auteurs à suggérer l'utilisation de ces critères pour la sélection précoce des clones résistants.

Après 12 jours, un milieu de culture de *Corynespora* (Czapek) a été filtré, puis concentré ou non, par lyophilisation, et des jeunes feuilles ont été mises à tremper, en lumière continue, par leur pétiole, dans ces extraits. Le flétrissement des feuilles et le noircissement des nervures en arête de poissons étaient visibles dès 24 h chez les clones sensibles (planche 3). L'intensité du flétrissement a été mesurée par la diminution de la teneur en eau par rapport à un témoin sans toxine. Par ailleurs, le dépôt de 10 µL du même milieu à la surface d'une feuille lésée par une aiguille fine entraîne la formation d'une zone nécrotique et l'aspect en arête de poisson des nervures (planche 4).

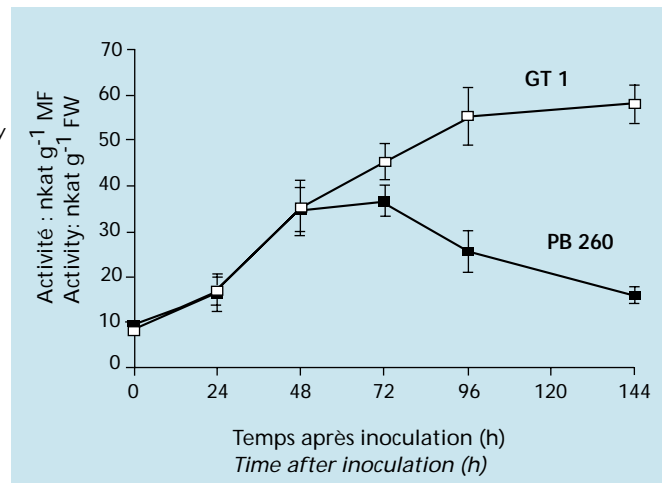
L'utilisation de ce milieu contenant la toxine de *Corynespora* pour ces 2 biotests (flétrissement et nécrose) conduit à la même classification des 4 clones considérés : GT 1 (R), PB 235 et RRIC 100 (RP), et PB 260 (S). Le fait que le biotest, impliquant l'application de la toxine sur les feuilles nécessite une très légère blessure de l'épiderme (Liyanage et Liyanage, 1986), semble indiquer que la toxine serait incapable de pénétrer la barrière épidermique sans une dégradation préalable pouvant être causée par les enzymes excrétées par le pathogène.

Des expériences menées au Cameroun en utilisant la toxine excrétée dans le milieu de germination (eau stérile) d'un isolat local de *Corynespora* ont permis de comparer le comportement des feuilles de

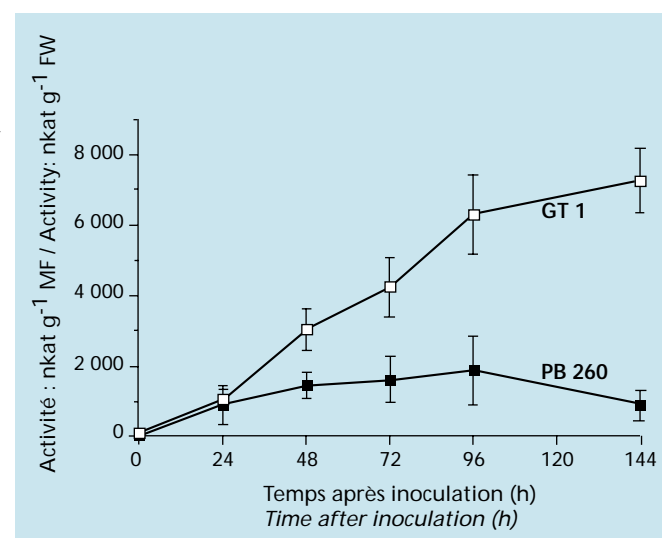
**Figure 3.** Evolution de l'activité chitinase de feuilles inoculées par un isolat philippin de *Corynespora*. / Evolution of chitinase activity of leaves inoculated with a *Corynespora* isolate from the Philippines.



**Figure 4.** Evolution de l'activité β-1,3 glucanase de feuilles inoculées par un isolat philippin de *Corynespora*. / Evolution of β-1,3 glucanase activity of leaves inoculated with a *Corynespora* isolate from the Philippines.



**Figure 5.** Evolution de l'activité peroxydase de feuilles après inoculation de *Corynespora* (Philippines). / Evolution of the peroxidase activity of leaves after inoculation with a *Corynespora* isolate from the Philippines.



7 clones dont le pétiole trempait, à la lumière, dans ce milieu de germination. La mesure du flétrissement foliaire entre 12 et 72 h après traitement (tableau 3) a conduit au classement habituel de la R/S de ces clones.

Une étude comparant l'inoculation par des spores à l'application foliaire du liquide de germination contenant la toxine a été

menée sur 8 clones. Une corrélation significative a été établie entre ces 2 biotests 48 h après le traitement (tableau 3). Une distribution cohérente des clones R, RP et S le long de la droite de régression a été obtenue (figure 6).

Par ailleurs, la toxine a été extraite du milieu de culture de *Corynespora* par filtration (0,22 µm), chromatographie sur co-



Tableau 3. Influence de la toxine de *Corynespora* sur le flétrissement foliaire.  
Effect of the *Corynespora* toxin on leaf wilting.

Clones / Clones	Heures après trempage dans le fluide de germination Hours after soaking in the germination fluid			
	12	20	53	72
RRIC 100	0	1	2	3
PR 107	0	1	2	3
BPM 24	0	0	1	1
Avros 2037	0	0	1	3
GT 1	0	0	1	1
RRIM 706	0	0	0	0
PB 217	0	0	0	0

Le fluide de germination des spores de *Corynespora* induit le flétrissement des feuilles trempant dans ce milieu.

The germination fluid from *Corynespora* spores induces the wilting of leaves soaked in this medium.

Pas de flétrissement / No wilting (0) — Feuilles flacides / Slight wilting (1) — Feuilles grillées / Scorched leaves (3)

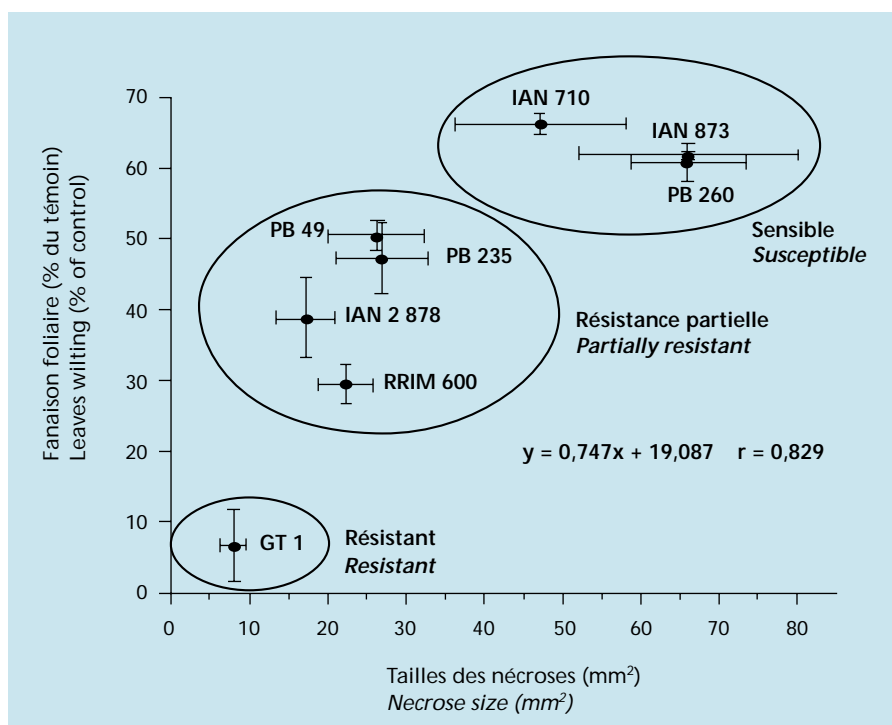


Figure 6. Relation entre le flétrissement des feuilles induit par trempage des pétioles dans une solution de toxine et la taille des nécroses induite par inoculation foliaire de spores d'un isolat de *Corynespora*. / Relation between the leaf wilting induced by soaking the petiole in a toxin solution and the size of the necrosis induced by leaf spore inoculations with a *Corynespora* isolate.

lonne de DEAE, précipitation au sulfate d'ammonium, filtration moléculaire sur gel (ACA 202 et TSK G3000SW) et électrophorèse en présence de SDS. Ces analyses conduisent à penser que la toxine est un petit glycopeptide de 17 acides aminés dont le poids moléculaire apparent serait de 7,5 kDa.

La toxine de *Corynespora*, obtenue dans nos conditions de culture, a été extraite par des techniques différentes de celles utilisées pour l'obtention des toxines d'*Helminthosporium* et de *Drechslera*, telles les ophiobolines et les catenarines. Elle n'est pas non plus extractible par divers solvants

classiques des toxines phénoliques ou terpénoides.

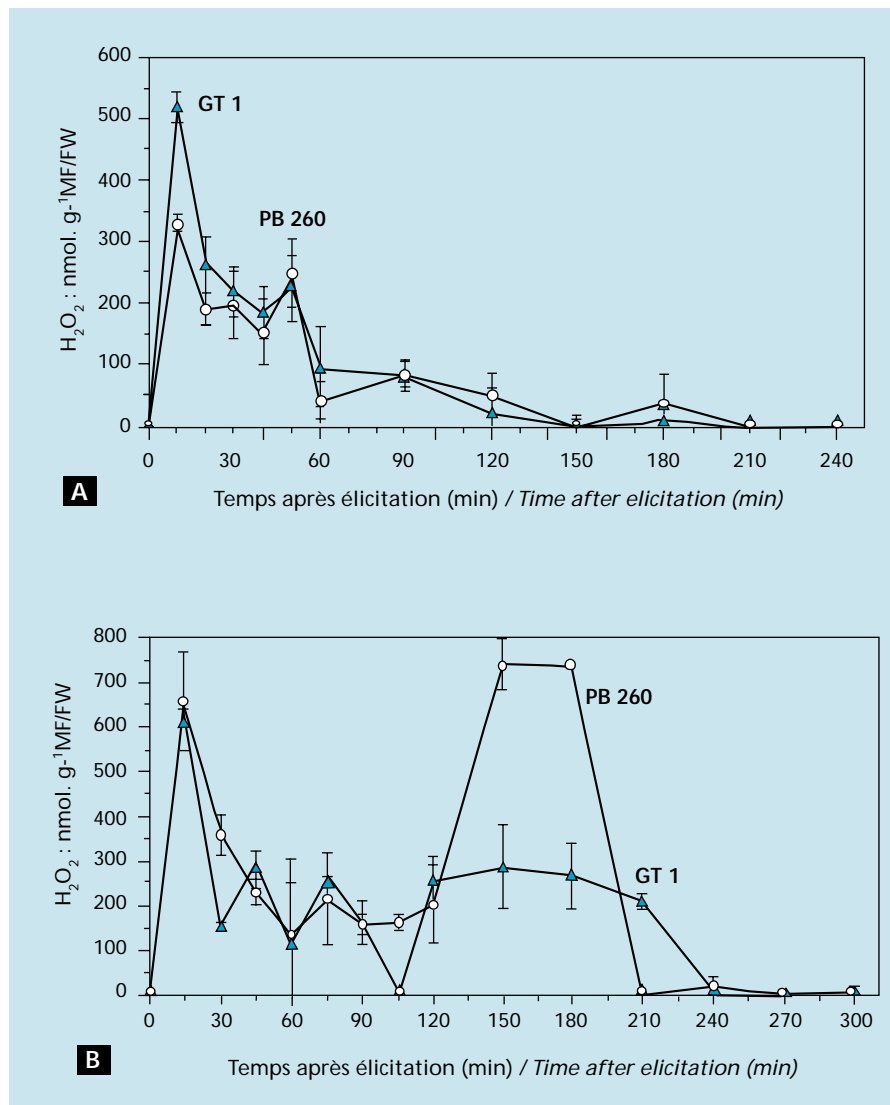
Il est couramment admis, aujourd'hui, que les AOS sont directement impliquées durant les toutes premières phases de l'interaction hôte-pathogène. Soit elles interviennent dans la HR conduisant à l'arrêt immédiat de l'attaque, soit elles commandent la mise en place des mécanismes de défense conduisant à une plus ou moins grande résistance de l'hôte (Medhi, 1994 ; d'Auzac, 1996). Parmi les AOS, l'ion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$  et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) sont les plus souvent analysés. Ils sont produits très précocement, dès que

l'éliciteur a établi le premier contact biochimique entre l'hôte et le pathogène et la cinétique de la production de  $H_2O_2$  est souvent prise en compte pour distinguer les réactions compatibles des réactions incompatibles (Dixon *et al.*, 1994).

Le premier pic d' $H_2O_2$ , produit instantanément lors du contact entre l'éliciteur et son récepteur sur la cellule hôte, est commun aux réactions compatibles et incompatibles. En revanche, un second pic de  $H_2O_2$ , plus tardif, est considéré par de nombreux auteurs comme caractéristique de la réaction d'hyper-sensibilité. Une telle cinétique de la production instantanée de  $H_2O_2$  a été suivie lors de la mise en contact de disques foliaires de GT 1 et d'un filtrat de culture de *Corynespora* parallèlement avec un filtrat de culture de *Colletotrichum gloeosporioides*. L'interaction *Corynespora*-GT 1 conduit au seul premier pic de  $H_2O_2$ , tandis qu'un important second pic est observé lors de l'interaction *Colletotrichum*-PB 260 (figures 7A, 7B). Ces résultats peuvent traduire l'existence d'une réaction HR pour le PB 260 et non pour le GT 1. Ils confirment, ainsi, de précédentes observations histologiques qui avaient montré (dans nos conditions expérimentales) une réaction HR entre *Colletotrichum* et PB 260 (Sénéchal *et al.*, 1987). Des observations à l'œil nu ou au microscope de ces 2 interactions montrent d'importantes différences entre ces 2 interactions. Le plus faible nombre de cellules endommagées et les nécroses de plus petite taille sont caractéristiques de l'interaction *Colletotrichum*-PB 260.

## Discussion - Conclusion

L'existence d'une importante variabilité entre les isolats de *Corynespora* provenant de pays différents mais aussi d'une même plantation est aujourd'hui clairement confirmée. Il en découle que l'estimation du degré de R/S d'une collection de clones nécessite de tester plusieurs isolats soigneusement sélectionnés. Une telle procédure a été suivie pour la sélection de clones résistants au *Microcyclus* (Rivano, 1992). Cependant, des clones considérés résistants lors de leur sélection peuvent devenir sensibles par suite d'une évolution du pathogène. C'est particulièrement le cas des clones à résistance totale (verticale) plus facile à contourner que des résistances partielles (horizontales), constituées par la synergie de plusieurs mécanismes de défense inductibles. Il paraît donc nécessaire d'acquérir une connaissance suffisante des différents mécanismes de résistance de l'hévéa afin de connaître ceux qui confèrent



**Figure 7A-7B. A :** Cinétique de la production d' $H_2O_2$  par des disques foliaires après traitement par un filtrat d'un milieu de culture de *Corynespora*. / *Kinetic of the  $H_2O_2$  production by leaves disks after treatment by a filtrate of a *Corynespora* culture medium*. — **B :** Cinétique de la production d' $H_2O_2$  par des disques foliaires après traitement par un filtrat d'un milieu de culture de *Colletotrichum*. / *Kinetic of the  $H_2O_2$  production by leaves disks after treatment by a filtrate of a *Colletotrichum* culture medium*.

à un clone une bonne résistance partielle. On ne possède pas, aujourd'hui, les acquis nécessaires chez l'hévéa.

Les résultats présentés ici montrent que 3 mécanismes différents de résistance (phytoalexine, protéines de défenses et lignification) sont incapables de stopper les attaques extrêmement rapides de *Corynespora*.

Toutefois, quelques observations réalisées en microscopie électronique à balayage de l'épiderme foliaire de GT 1 et PB 260, inoculés par une souche philippine, montrent après 24 h des différences notables dans l'aspect de la nécrose (taille et profondeur) produite par le pathogène à son site de pénétration.

L'expérience montre que des spores germant dans de l'eau pure excrètent une

toxine susceptible de diffuser de cellules en cellules et de provoquer les mêmes symptômes foliaires que l'inoculation directe par des spores. Le filtrat de culture de *Corynespora* produit les mêmes effets. Des expérimentations préliminaires mettent en évidence :

- que la virulence de différents isolats de *Corynespora* semble être directement liée à leur production de toxine ;
- une corrélation positive entre la R/S des clones vis-à-vis de la toxine et leur R/S vis-à-vis du champignon.

Cependant, ces résultats comparativement à ceux obtenus sur d'autres toxines fongiques laissent à penser que cette molécule serait le facteur essentiel de la virulence de *Corynespora*. Il reste toutefois im-

portant de montrer que la même molécule toxique est produite lors des toutes premières phases de l'agression des feuilles par *Corynespora, in planta*.

La résistance de certains clones peut dépendre de leur aptitude à neutraliser la toxine ou du fait que celle-ci soit peu ou pas du tout reconnue par les membranes cellulaires de l'hôte.

S'il est établi une corrélation suffisamment étroite entre la détermination de la résistance d'un clone par l'application foliaire *in vitro* de toxine et par les méthodes habituelles, l'application de toxine, sur champs dans des conditions écoclimatiques naturelles, constituerait une méthode simple, pratique, rapide et sans risque pour déterminer le degré de résistance/sensibilité (R/S) d'un grand nombre d'arbres sur un champ polyclonal, dans un état physiologique donné. Des anticorps préparés contre cette toxine pourraient être également employés pour tenter de relier la virulence d'un isolat à la quantité de toxine qu'il produit. ■

#### Remerciements

Nous remercions F. Pinard, phytopathologiste Cirad-cp, pour les isolats de *Corynespora cassiicola*, et la société Hévécam pour son efficace coopération.

#### Abréviations

AOS : Formes actives d'oxygène  
HPLC : Chromatographie liquide à haute performance  
HR : Réaction d'hypersensibilité  
IRRDB : International Rubber Research Development Board  
ITS : Séquences internes transcrites des ADN ribosomaux  
R : Résistant  
S : Sensible  
R/S : Résistance/sensibilité  
RAPD : *Random Amplified Polymorphic DNA*  
RFLP : *Restriction Fragment Length Polymorphism*  
RP : Résistance partielle  
RT : Résistance totale  
RRIC : Rubber Research Institute of Ceylan  
RRIM : Rubber Research Institute of Malaysia  
SDS : *Sodium dodecyl sulfate*  
TLC : *Chromatographie en couche mince*

## Bibliographie / References

- BELMAS J.C., 1996. Mise au point du dosage de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par chimioluminescence. Application à l'interaction de l'*Hevea brasiliensis* avec *Corynespora cassiicola* et *Colletotrichum gloeosporioides*. DEA, université Montpellier II, Montpellier, France, 12 p.
- BRETON F., SANIER C., D'AUZAC J., 1996. Réactions de défense de l'*Hevea* après infection par *Corynespora cassiicola* : implication d'une toxine dans le déterminisme de la réponse clonale ? IV<sup>e</sup> congrès de la société française de phytopathologie, Nice, France, 19-23 novembre 1996. Paris, France, Société française de phytopathologie, p. F9.
- BRETON F., SANIER C., D'AUZAC J., 1997. Scopoletin degradation in relation to resistance of *Hevea brasiliensis* to *Corynespora cassiicola*. J. Plant Physiol. (sous presse).
- CHEE K.H., 1988a. *Corynespora* leaf spot. Planters' Bulletin 194 : 3-7.
- CHEE K.H., 1988b. Studies on sporulation, pathogenicity and epidemiology of *Corynespora cassiicola* on hevea rubber. J. Nat. Rubber Res. 3 (1) : 21-29.
- CHOW K.S., LOW F.C., HASHIM J., 1992. DNA polymorphisms in the fungus *Corynespora cassiicola*. Seminar biotechnology Kebangsean, Subang, Java.
- D'AUZAC J., 1996. Toxic oxygen: protection against pathogens. Plant. Rech. Dév. 3 (3) : 153-170.
- DIXON R.A., HARRISSON M.J., LAMB C.J., 1994. Early events in the activation of plant defence response. Annu. Rev. Phytopathol. 32 : 479-501.
- GARCIA D., 1995. Contribution à l'étude de la résistance totale et partielle dans l'interaction hôte-parasite *Hevea* sp. - *Microcyclus ulei*. Aspects histologiques et biochimiques des réactions impliquées dans ces résistances. Thèse de doctorat, université Montpellier II, Montpellier, France, 196 p.
- GARCIA D., CAZAUX E., RIVANO F., D'AUZAC J., 1995 a. Chemical and structural barriers to *Microcyclus ulei*, the agent of south american leaf blight in *Hevea* spp. Eur. J. For. Pathol. 25 : 282-292.
- GARCIA D., SANIER C., MACHEIX J.J., D'AUZAC J., 1995 b. Accumulation of scopoletin in *Hevea brasiliensis* (P. Henn.) V. ARX and evaluation of its fungitoxicity for three leaf pathogens of rubber-tree. Physiol. Mol. Plant Pathol. 47 (4) : 213-223.
- GASPAROTTO L., FERREIRA F.A., JUNQUEIRA N.T.V., 1988. *Corynespora* leaf spot of rubber (*Hevea brasiliensis*) in Brazil. Fitopatol. Bras. 13 (3) : 278-280.
- GIESEMANN A., BIEHL B., LIEBEREI R., 1986. Identification of scopoletin as a phytoalexin of the rubber-tree *Hevea brasiliensis*. J. Phytopathol. 117 : 373-376.
- HALLÉ F., MARTIN R., 1986. Etude de la croissance rythmique chez l'hévéa (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.) euphorbiacées, crotonoïdées. Adansonia 8 : 475-503.
- HILTON R.N., 1952. Bird's eye spot disease of *Hevea* rubber tree caused by *Helminthosporium heveae*. J. Rubb. Res. Inst. Malaya 14 : 40-92.
- JOSEPH A., RAJALKSHMY V.K., ARTHASSERY S., 1987. Efficacy of fungicides in the control of «Bird's eye spot Disease» in rubber nurseries. J. Plant. Crops 15 (1) : 57-71.
- KAI-MING Z., CHEE K.H., 1989. Hevea diseases of economic importance in China. THE PLANTER 65 (754) : 3-8.
- LIYANAGE N.I.S., LIYANAGE A.S., 1986. A study on the production of a toxin in *Corynespora cassiicola*. J. Rubber Res. Inst. Sri Lanka 65 : 51-53.
- MEHDI M.C., 1994. Active oxygen species in plant defence against pathogens. Plant Physiol. 105 : 467-472.
- MUCHOVEJ J.J., MUCHOVEJ R.M.C., 1990. *Bipolaris heveae* revisited. Mycotaxon 39 : 27-30.
- NUGAWELA A., LIYANAGE N.I.S., LIYANAGE A.S., ALUTHEWAGE R.K., 1989. Influence of infection by *Corynespora cassiicola* on carbon dioxide assimilation rate in *Hevea* leaves. J. Nat. Rubber Res. 4 (4) : 233-238.
- ONESIRAN P., MABUNI C.T., DURBIN R.D., MORIN R.B., RICH D.H., ARNY D.C., 1975. Toxin production by *Corynespora cassiicola*. Physiol. Plant Pathol. 5 : 289-275.
- PURWANTARA A., 1987. A histological study of *Hevea* leaves infected by *Corynespora cassiicola*. Menara Perkebunan 55 (3) : 47-49.
- RADZIAH N.Z., HASHIM I., 1990. Major leaf diseases of rubber and their management. Rubber Board Bulletin 26 (2) : 20-25.
- RENISH W.J., ONESIROSAN P.T., BLISS F.A., ARNY D.C., 1975. Reaction of tomato to target leaf spot using spore inoculation and a toxin test. Hort. Science 10 (2) : 163-165.
- RIVANO F., 1992. La maladie sud-américaine des feuilles de l'hévéa. Etude en conditions naturelles et contrôlées des composants de la résistance partielle à *Microcyclus ulei*. Thèse de doctorat, université Paris XI, Orsay, France, 257 p.
- RIVANO F., NICOLAS D., CHEVAUGEON J., 1989. Résistance de l'*Hevea* à la maladie sud-américaine des feuilles. Perspectives de lutte. Rev. Gén. Caout. Plast. 66 (690) : 199-206.
- SARMA Y.R., NAYUDU M.Y., 1975. Toxin production by *Corynespora cassiicola* (Berk and Curt) Wei. Current Science 44 : 172.
- SÉNÉCHAL Y., SANIER C., GOHET E., D'AUZAC J., 1987. Différents modes de pénétration de *Colletotrichum gloeosporioides* dans les feuilles d'*Hevea brasiliensis*. C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. III, 305 (3) : 537-542.
- SILVA W.P.K., MULTANI D.S., DEVERALL B.J., LYON B.R., 1995. RFLP and RAPD analysis in the identification of isolates of the leaf spot fungus *Corynespora cassiicola*. Austr. J. Bot. 43 : 609-618.
- SIMMONDS N.W., 1989. Breeding horizontal resistance to south american leaf blight of rubber. J. Nat. Rubber Res. 5 (2) : 102-113.
- SINULINGGA W., ALWI N., ABBAS L.J., HUTABARAT T.S.M., 1990. Pathogenicity of *Corynespora cassiicola* isolated from several rubber clones on GT1. Buletin Perkaretan 8 (1) : 3-8.
- TAM A.M., 1990. Survey on *Corynespora* leaf fall disease. Planters' Bulletin 204 : 80-85.

# The interaction between *Corynespora cassiicola* and *Hevea brasiliensis*

Breton F.<sup>1</sup> Garcia D.<sup>2</sup>, Sanier C.<sup>3</sup>, Eschbach J.M.<sup>3</sup>, d'Auzac J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de biotechnologie et physiologie végétale appliquée, université Montpellier II, 34095 Montpellier Cedex 5, France

<sup>2</sup> Institut français du caoutchouc, 42 rue Scheffer, 75116 Paris, France

<sup>3</sup> CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

The first findings on *Corynespora* attacks were presented at the November 1987 IRRDB symposium in Thailand. The limited research work published since includes short reviews of leaf fall (Radziah and Hashim, 1990; Tam, 1990) and leaf necroses (Chee, 1988a; Gasparotto *et al.*, 1988; Kai-Ming and Chee, 1989) caused by *Corynespora*. A few more fundamental publications on this relatively unknown fungus covered sporulation, pathogenicity and epidemiology (Chee, 1988b), symptomatology of photosynthetic intensity after infection (Nugawela *et al.*, 1989), and the pathogenicity and polymorphism of different isolates (Sinulingga *et al.*, 1990; Chow *et al.*, 1992).

The three terms birds eye spot, leaf spot disease and leaf fall disease all refer to attacks by *Corynespora*. However, several fungi can cause the same leaf symptoms. For Chee (1988b), *Corynespora cassiicola* is synonymous with *Corynespora melonis*, *Helminthosporium cassiicola*, *Helminthosporium vignae*, *Helminthosporium papaya* and *Corynespora vignicola*. According to Kai-Ming and Chee (1989), birds eye spot is caused by *Drechslera heveae*, whilst Muchovej and Muchovej (1990) asserted that *Helminthosporium heveae* should be correctly classified as *Bipolaris heveae*.

RAPD analysis of the internal transcribed spacer (ITS) regions of ribosomal DNA and RFLP analysis of total DNA by Silva *et al.* (1995) succeeded in distinguishing between different *Corynespora* strains and a phylogenetically very similar *Helminthosporium*, and between some *C. cassiicola* isolates from Sri Lanka. The same type of analysis of the rDNA of four *Corynespora* isolates collected in the Philippines, Cameroon and Gabon recently revealed almost 100% homology for 600 base pairs analysed and 92.3% homology with *Drechslera catenaria*, a loculoascomycete also known as *Helminthosporium catenarium*.

The aim of our research was to classify *Hevea* clones according to their R/S with respect to *C. cassiicola*. An analysis of published results

clearly shows that clonal resistance depends on the isolate used. Clone GT 1, considered only slightly susceptible by Chee (1988a) in Malaysia and by Liyanage and Liyanage, (1986) in Sri Lanka, proved highly susceptible at Sunghi Puthi (Sumatra) (Sinulingga *et al.*, 1990) and appears to be highly resistant in Cameroon.

The fact that total (vertical) monogenic resistance can easily be circumvented by the pathogen means that oligogenic (horizontal) resistance, resulting from a combination of multiple defence mechanisms, even if they are individually less effective, is preferable (Rivano *et al.*, 1989; Simmonds, 1989). As a result, for valid selection of resistant clones, it is essential to understand the main *Hevea* defence mechanisms involved in resistance.

## Material and Methods

*Hevea* clones grafted onto stumps grown from GT 1 seeds were grown in pots in the tropical greenhouses at the University of Montpellier II and at CIRAD<sup>1</sup>. Leaf samples were taken at stage B<sub>2</sub>-C (Hallé and Martin, 1986) and maintained for several days on damp filter paper in sealed Petri dishes after inoculation with 10 µL droplets of a *Corynespora* conidial suspension (2-2.5.10<sup>4</sup> conidia/mL; 3 to 4 droplets/cm<sup>2</sup>). The conidial suspensions were obtained after ten days' culture in the dark, in Petri dishes on PDA medium, followed by three days in the light. The spores were collected by scraping the mycelium under sterile water.

Further inoculations were performed in Cameroon on clones grown in polybags in an air-conditioned room at the Hevecam Rubber Estate (t = 27 ± 2°C, RH: 90-100 %, photoperiod: 12 h). The *Corynespora* spore suspension (10<sup>5</sup> spores/mL), obtained by culturing monospore isolates, were inoculated onto the abaxial side of young leaves (stage B<sub>2</sub>-C) by spraying.

## Methods for estimating clonal susceptibility to *Corynespora*

After inoculating the leaves in Petri dishes, the leaf necroses were observed visually and their diameter measured one, two, three and four days after inoculation. Vein browning, which causes a

"fishbone" pattern, was observed, as was mycelium growth, to see whether it grew all over the leaf surface or was limited to the point of necrosis.

Under UV light, the inoculum droplets were fluorescent less than 24 h after inoculation, and remained so for several days. This fluorescence was entirely due to a *Hevea* phytoalexin, scopoletin (Scp) (Giesemann *et al.*, 1986), which was identified and quantified by TLC, HPLC and spectrofluorimetry (Garcia *et al.*, 1995b).

Peroxidases and two proteins linked to pathogenesis, chitinase and β-1.3 glucanase, were analysed on the leaves after homogenization and extraction with a pH 5.5 buffer.

Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) produced instantly by leaf discs brought into contact with a *Corynespora* culture filtrate was analysed by luminol chemiluminescence using a scintillation counter in "out of coincidence" mode, a method developed by Belmas (1996).

For the inoculations carried out in an air-conditioned room, the observations were primarily of symptomatology, taking account of criteria established previously by long-term research on the interaction between *Microcyclus ulei* and *Hevea* (Rivano, 1992; Garcia, 1995). The size and number of lesions, Scp accumulation, the elapsed time between inoculation and the development of the infection, infection frequency, disease severity, the time taken for stomata to form, leaf deformation and leaf fall were all taken into account as major resistance components.

Histological observations were carried out on cross sections of inoculated leaflets. Toluidine blue and phloroglucinol were used to develop phenols and lignin respectively (Garcia *et al.*, 1995a).

## Results

Over ten years of experiments on the interaction between *Microcyclus ulei* and *Hevea brasiliensis* led to the definition of symptomatological parameters required to determine the degree of clonal R/S. Two biochemical parameters can detect two other components partly correlated to *Hevea* resistance mechanisms: the speed and extent of phytoalexin (Scp) accumulation and, a few days after, the development of a lignin barrier which imprisons the fungus within the necrotic zone.

This article corresponds to a paper presented at the Workshop on *Corynespora* leaf fall disease of Hevea rubber, organized in Medan by the Indonesian Rubber Research Institute, on 16th and 17th December 1996.

<sup>1</sup> Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement.



Detached leaves of different clones were inoculated at the Montpellier laboratory with *Corynespora* strains from the Philippines, Cameroon and Gabon. GT 1 had total resistance (TR) to four isolates, whilst PB 260 proved highly susceptible (S). Clones PB 235 and RRIC 100 showed partial resistance. Necrosis size, the fishbone pattern and mycelium development within and outside the necrotic zone were used to judge the R/S of these four clones (plate 1).

*Corynespora* attacks very rapidly, and the first visible signs of infection appeared 24 h after inoculation, whilst *Colletotrichum gloeosporioides* took 48 h under the same conditions.

In Cameroon, experiments were carried out on non-detached leaves, in an air-conditioned room, on clones GT 1 and RRIC 100 inoculated with a local *C. cassicola* isolate at concentrations of between  $7.10^4$  and  $3.5.10^2$  spores/mL. The results confirmed the resistance of GT 1 and the susceptibility of RRIC 100 at the highest inoculum densities (table 1).

Five *Corynespora* monospore isolates sampled from trees of clone PB 260 were inoculated onto stage B<sub>2</sub> leaves sampled from five clones so as to classify them according to their R/S. Inoculation time, the time taken to sporulate, the number of lesions and the extent of leaf deformation were taken into account. It was seen (table 2) that the monospore isolates from a given susceptible clone revealed different degrees of aggressiveness (R, S or PR). The same type of experiment on older leaves (stage C) produced different results. For instance, RRIC 100 was less susceptible, whereas RP 107 was more so (table 2). The classification of these clones in order of decreasing resistance was, in our experimental conditions: GT 1 = PR 107 > Avros 2037 > RRIC 706 > RRIC 100.

The speed and extent of Scp accumulation were correlated to *Hevea* resistance to *Microcyclus* (Garcia *et al.*, 1995a,b). In clone GT 1, Scp production seemed to be too slow and too insubstantial to account for its resistance (figure 1) (Breton *et al.*, 1997).

Whereas the protein contents of GT 1 leaves inoculated in Petri dishes remained stable over the six days of the experiment, the considerable tissue breakdown in PB 260 was reflected in a marked and rapid reduction in contents (figure 2).

The formation kinetics of two defence proteins (Pathogenesis Related proteins), chitinase (figure 3) and  $\beta$ -1,3 glucanase (figure 4) were also inadequate to explain the difference in R/S between clones GT 1, PB 235 and PB 260. Only peroxidase activity (guaiacol-oxidases), which are often associated with defence mechanisms, seemed to be substantially greater in GT 1 (figure 5) (Breton *et al.*, 1996).

During the first 48 h after inoculation, the halt in mycelium propagation cannot be attrib-

uted to cell wall strengthening via lignin deposition, since this was not observed for any of the three clones until some ten days after inoculation. However, although early cell wall strengthening by wall protein reticulation cannot be ruled out (d'Auzac, 1996), the defence mechanisms of GT 1 are still a mystery.

Observations of cross sections of leaves inoculated with the Philippine *Corynespora* strain revealed substantial differences between susceptible and resistant clones. For instance, 48 h after inoculation, small necrotic spots limited to a few cells around the penetration zone were seen on GT 1 and an unidentified yellow substance accumulated in the necrotic zone. Around the zone, the existence of starch granules and the appearance of the nuclei revealed the absence of infection (plate 2). The cross sections of very susceptible PB 260 leaves were very different: the majority of the cells, well beyond the penetration zone, seemed to be empty, nucleus condensation revealed their degeneration and there were no starch granules. Almost all the observable cells well away from the necrosis were degenerating. This observation suggests that a toxin, rapidly produced by *Corynespora*, was involved.

Several authors have reported the presence of a toxin secreted by *C. cassicola* in liquid culture media (Onesiran *et al.*, 1975; Sarma and Nayudu, 1975). However, the first group considered the toxin to be a cationic hydrophilous compound, whereas for the second group, it was hydrophobic and soluble in solvents such as benzene and ethyl acetate. The existence of a toxin produced by *Corynespora* was also observed by Purwantara (1987) and Nugalewa *et al.* (1989). Liyanage and Liyanage (1986) prepared a crude filtrate of a *Corynespora* culture medium and placed 1  $\mu$ L of the extract, *in vivo* or *in planta*, on *Hevea* leaves wounded beforehand with a fine needle. Necrosis size after 72-96 h, or leaf fall after a week were measured, leading the authors to suggest that these criteria could be used for early selection of resistant clones.

After 12 days, a *Corynespora* culture medium (Czapek) was filtered, then either concentrated by freeze drying or not, and the petioles of young leaves were soaked in the extracts under continuous light. Leaf wilting and vein blackening, forming a fishbone pattern, were seen after 24 h in susceptible clones (plate 3). Wilting intensity was measured by the reduction in water content compared to a control without the toxin. Depositing 10  $\mu$ L of the same medium on a leaf wounded with a fine needle led to the formation of a necrotic zone and of the fishbone vein pattern (plate 4).

Using the medium containing the *Corynespora* toxin for these two bioassays (wilting and necrosis) produced the same classification

for the four clones tested: GT 1 (R), PB 235 and RRIC 100 (PR), and PB 260 (S). The fact that the bioassay involving toxin application to the leaves necessitates slightly wounding the epidermis (Liyanage and Liyanage, 1986) seems to suggest that the toxin would be incapable of penetrating the epidermic barrier without prior damage, perhaps caused by the enzymes secreted by the pathogen.

Experiments in Cameroon using the toxin secreted in the germination medium (sterile water) of a local *Corynespora* isolate compared the performance of leaves from seven clones whose petiole was soaked in the germination medium, in the light. Leaf wilting between 12 and 72 h after treatment (table 3) produced the usual R/S classification for these clones.

A study was conducted on eight clones to compare inoculation with spores and leaf applications of the germination medium containing the toxin. A significant correlation was established between the two bioassays 48 h after treatment (table 3). R, PR and S clone distribution along the regression line was consistent (figure 6).

In addition, the toxin was extracted from the *Corynespora* culture medium by filtration (0.22  $\mu$ m), DEAE chromatography, precipitation with ammonium sulphate, gel filtration (ACA 202 and TSK G3000SW) and SDS electrophoresis. These analyses suggested that the toxin was a small glycopeptide with 17 amino acids and an apparent molecular weight of 7.5 kDa.

The *Corynespora* toxin obtained under our culture conditions was not extracted in the same way as *Helminthosporium* and *Drechslera* toxins such as ophiobolins and catenarins, nor could it be extracted by conventional solvents used for phenolic or terpenoid toxins.

It is now widely acknowledged that AOS are directly involved in the initial stages of the host-pathogen interaction. They are either involved in the Hypersensitive Response (HR) leading to the immediate arrest of the attack or they govern the triggering of defence mechanisms that provide the host with a greater or lesser degree of resistance (Medhi, 1994; d'Auzac, 1996). Amongst AOS, the superoxide ion  $O_2^{\cdot -}$  and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) are the most often studied. They are produced very early on, as soon as the elicitor has established the first biochemical contact between the host and the pathogen, and  $H_2O_2$  production kinetics is often taken into account to distinguish between compatible and incompatible reactions (Dixon *et al.*, 1994).

The first  $H_2O_2$  peak, which is produced instantly on contact between the elicitor and its receptor on the host cell, is common to compatible and incompatible reactions. However, the second, later  $H_2O_2$  peak is seen by many authors as characteristic of the Hypersensitive Response

(HR). These instant  $H_2O_2$  production kinetics was monitored by bringing GT 1 leaf disks into contact with a *Corynespora* culture filtrate, alongside PB 260 disks inoculated with a *Colletotrichum gloeosporioides* culture filtrate. *Corynespora*-GT 1 produced only the first  $H_2O_2$  peak, whilst there was a second, significant peak for the *Colletotrichum*-PB 260 interaction (figures 7A, 7B). These results may reflect the existence of an HR reaction in PB 260, but not in GT 1. They confirmed previous histological observations (under our experimental conditions), which revealed an HR between *Colletotrichum* and PB 260 (Sénéchal *et al.*, 1987). Observations of these two interactions with the naked eye or under a microscope detected substantial differences between the two interactions. The *Colletotrichum*-PB 260 interaction was characterized by a smaller number of damaged cells and by smaller lesions.

### Discussion - Conclusion

The existence of substantial variability between *Corynespora* isolates from different countries, but also from the same estate, has now been clearly confirmed. The result is that estimating the degree of R/S of a clone collection means testing several carefully selected isolates. This procedure was adopted for selecting clones resistant to *Microcyclus* (Rivano, 1992). However, clones that are considered resistant when selected can subsequently become susceptible due to pathogen evolution. This is particularly true for clones with total (vertical) resistance, which is easier to circumvent than partial (horizontal) resistances produced by synergy between several induced defence mechanisms. It is therefore important to be familiar with the different *Hevea* defence mechanisms in order to determine which ones provide a clone with partial re-

sistance. This information is not yet available for *Hevea*.

The results given above show that three different resistance mechanisms (phytoalexin, defence proteins and lignification) are incapable of arresting *Corynespora* attacks, which are extremely rapid.

Nevertheless, observations under a scanning electron microscope of the leaf epidermis of GT 1 and PB 260, inoculated with a Philippine strain, showed that after 24 h, there were marked differences in the appearance (size and depth) of the necrosis caused by the pathogen at the point of penetration.

The experiment showed that spores germinating in pure water secrete a toxin that can spread from cell to cell and cause the same leaf symptoms as direct inoculation with spores. *Corynespora* culture filtrates have the same effects. Preliminary trials demonstrated:

- that the virulence of different *Corynespora* isolates seemed to be directly linked to their toxin production;
- a positive correlation between the R/S of clones with respect to the toxin and their R/S with respect to the fungus.

However, compared to the results obtained with other fungal toxins, these results suggest that this molecule may be the essential factor in *Corynespora* virulence. Nevertheless, it is important to demonstrate that the same toxic molecule is produced during the initial phases of leaf attacks by *Corynespora*, *in planta*.

The resistance of certain clones may depend on their ability to neutralize the toxin or on the fact that the toxin is poorly or not recognized by its specific receptors.

If a sufficiently close correlation were to be established between the determination of clone resistance by applying the toxin to leaves *in vitro*

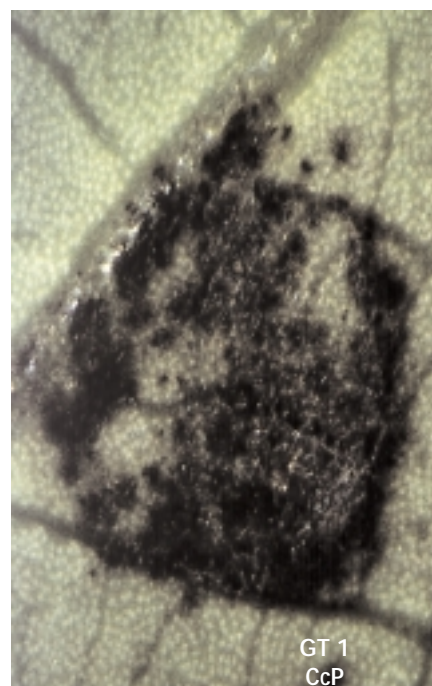
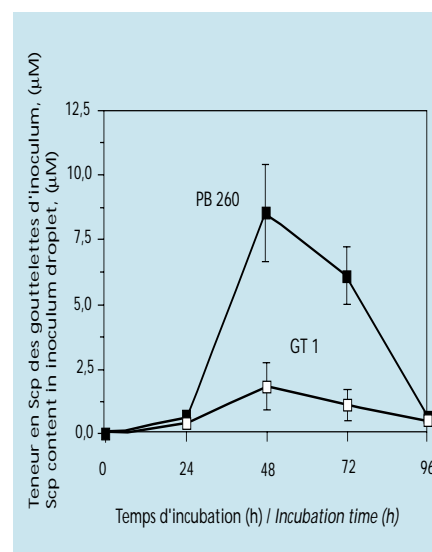
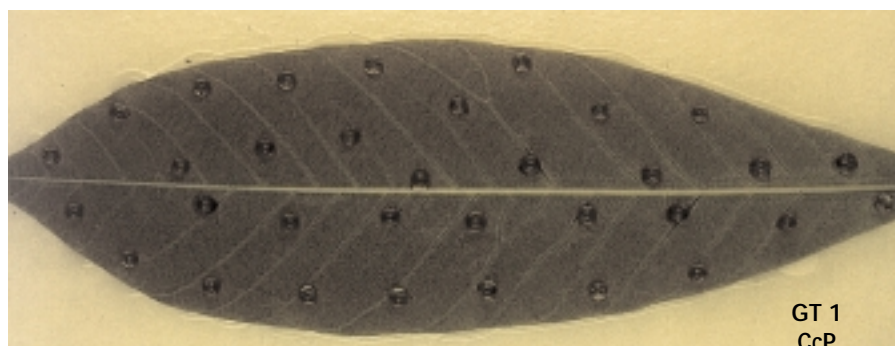
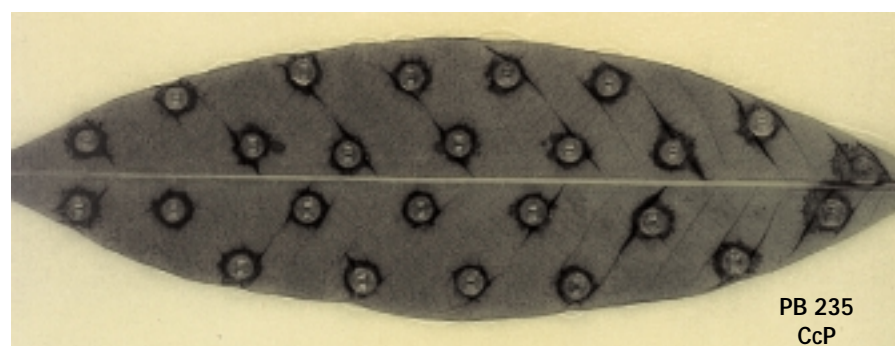
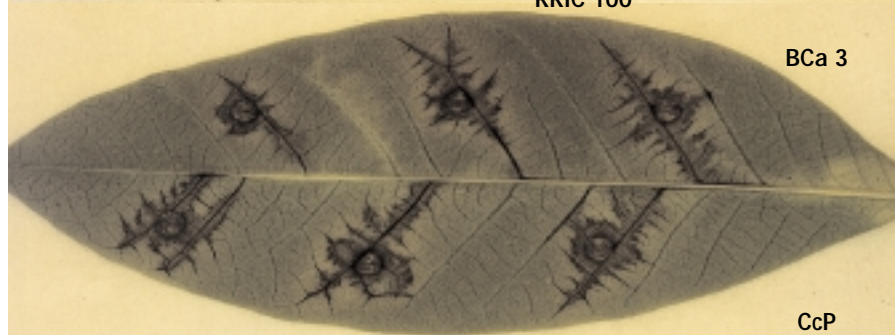
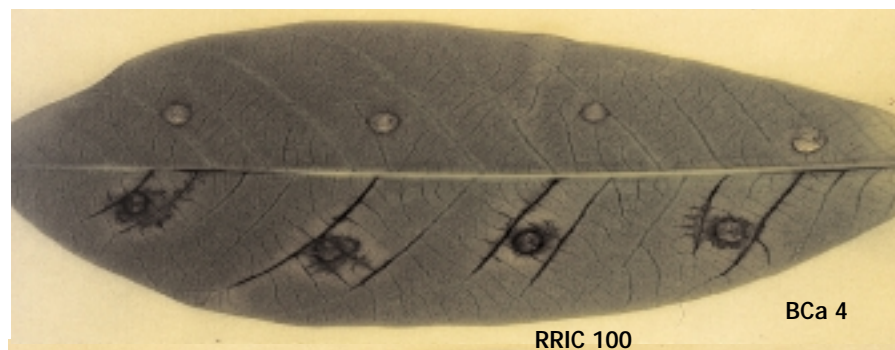
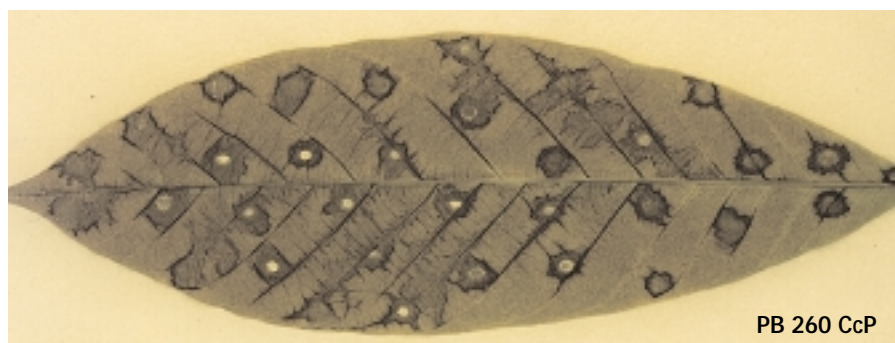
and by the usual methods, applying the toxin in the field, under natural ecoclimatic conditions, would be a simple, practical, rapid and risk-free way of determining the degree of resistance/susceptibility (R/S) of a large number of trees in polyclonal trials, in a given physiological condition. Antibodies against the toxin could also be used in an attempt to link the virulence of an isolate to the amount of toxin it produces. ■

### Acknowledgements

We should like to thank F. Pinard, a CIRAD-CP plant pathologist, for the *Corynespora cassicola* isolates, and the HEVECAM Company for its valuable cooperation.

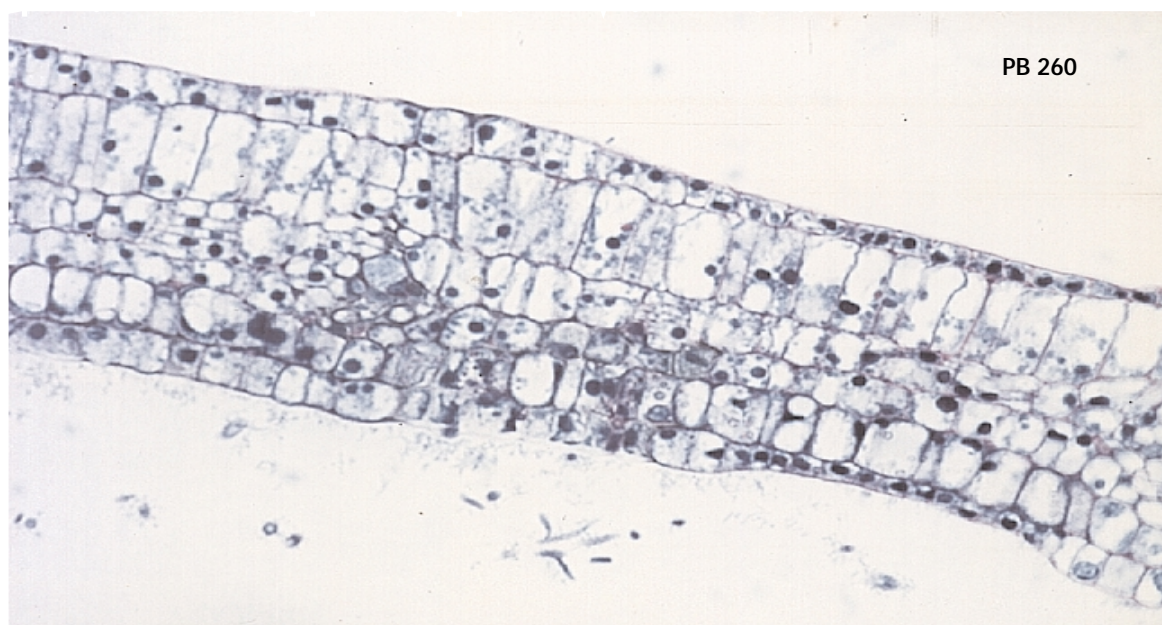
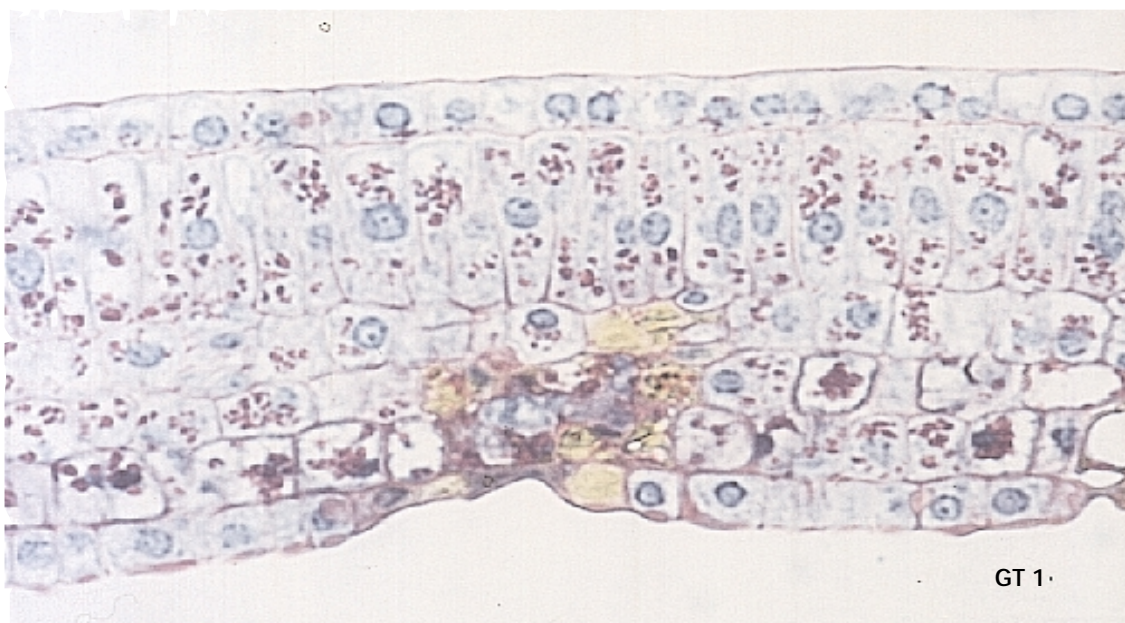
### Abbreviations

AOS: Active Oxygen Species  
HPLC: High Performance Liquid Chromatography  
HR: Hypersensitive Response  
IRRDB: International Rubber Research and Development Board  
ITS: Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer sequences  
PR: Partial Resistance  
R: Resistant  
S: Susceptible  
R/S: Resistance/Susceptibility  
RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA  
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism  
RRIC: Rubber Research Institute of Ceylon  
RRIM: Rubber Research Institute of Malaysia  
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate  
TLC: Thin Layer Chromatography  
TR: Total Resistance



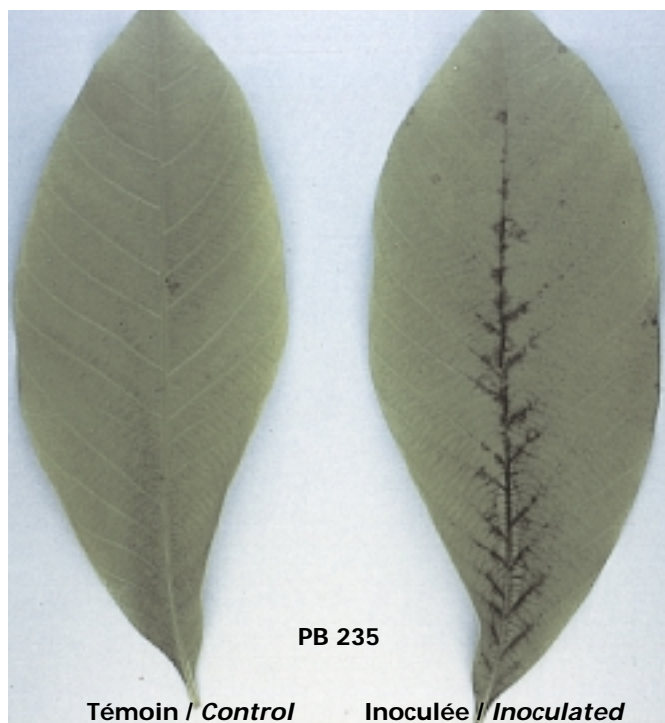
**Planche 1.** Nécroses observées sur des feuilles de 4 clones d'hévéa (GT 1, PB 260, PB 235, RRIC 100) 48 h après inoculation par des dépôts de 10 μL de suspensions conidiales de 3 isolats différents de *Corynespora* (CcP : *Corynespora philippin* ; BCa 3, BCa 4 : isolats camerounais).  
Necroses observed on the leaves of four Hevea clones (GT 1, PB 260, PB 235, RRIC 100) 48 h after inoculation with 10 μL of conidial suspensions of the 3 different *Corynespora* isolates (CcP : *Corynespora* from the Philippines; BCa 3, BCa 4 : isolates from Cameroon).



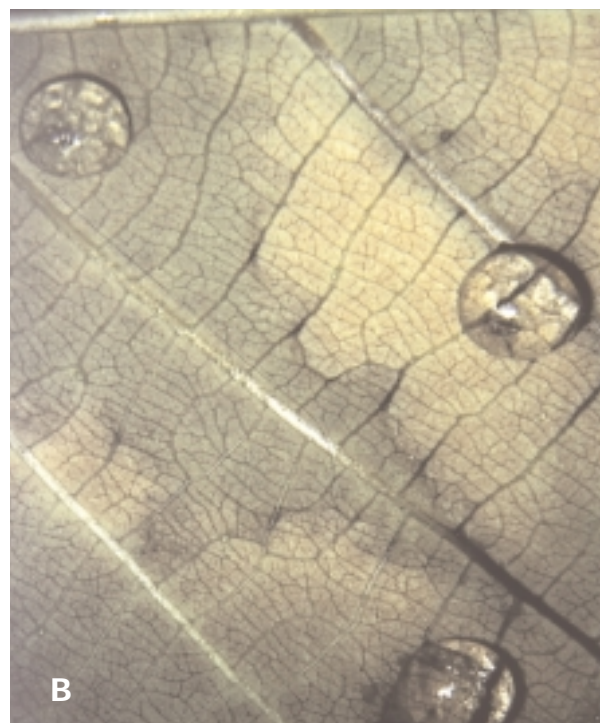
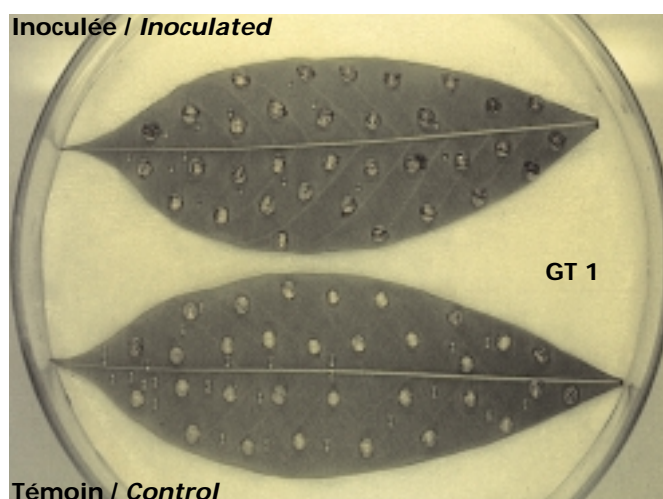
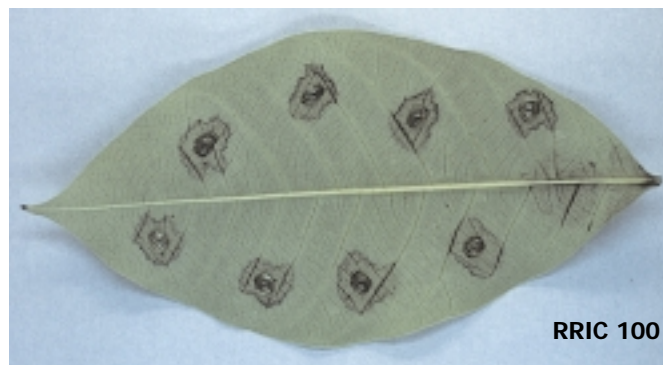
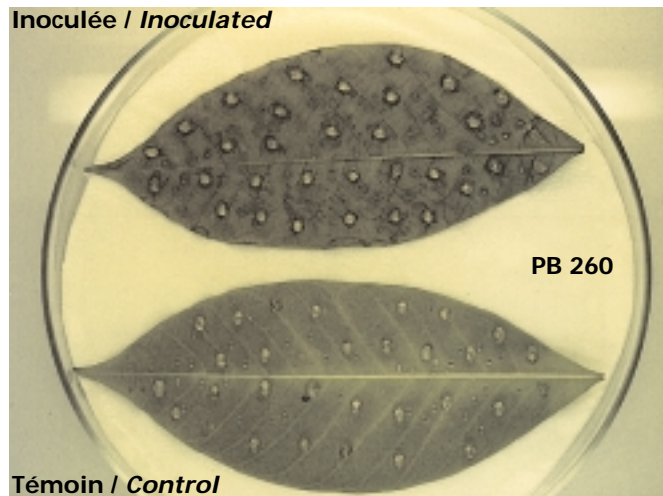


**Planche 2.** Section transversale de feuilles de GT 1 (résistant) et de PB 260 (sensible), 48h après dépôt de 10  $\mu$ L de suspension conidienne (CcP). / Cross section of leaves from GT 1 (resistant) and PB 260 (susceptible), 48h after depositing 10  $\mu$ L of conidial suspension (CcP).





**Planche 3.** Flétrissement et nécroses en « arête de poisson » obtenus par trempage de pétioles de feuilles dans un filtrat de culture de *Corynespora* en milieu liquide (PB 260 : S, PB 235 : RP, GT 1 : RT). / Wilting and "fishbone" necroses obtained by soaking leaf petioles in a *Corynespora* culture filtrate in a liquid medium (PB 260: S, PB 235: PR, GT 1: TR).



**Planche 4.** Nécroses obtenues 24h après dépôt de toxine brute sur des micro-blessures de la surface abaxiale de clone R : GT 1, RP : PB 235, RRIC 100, S : PB 260. Comparaison des nécroses obtenues après dépôt de toxine sur une blessure de la face abaxiale de feuilles (A) et après dépôts de spores (B). / Necroses obtained 24h after depositing a crude toxin on micro-wounds on the abaxial surface of clones classed as R: GT 1, RP: PB 235, RRIC 100, S: PB 260. Comparison of the necroses obtained after depositing the toxin on a wound on the abaxial side of leaves (A) and after depositing spores (B).